

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Einfluß von Natriumoxalat auf die hydrolytische und enzymatische Spaltung von Paraoxon

(E-600,0,0-Diäthyl-0-p-nitrophenyl-phosphat)

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Mei Lan Lie
aus Banjarmasin/Indonesien



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546219_0041

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Einfluß von Natriumoxalat auf die hydrolytische und enzymatische Spaltung von Paraoxon

(E-600,0,0-Diäthyl-0-p-nitrophenyl-phosphat)-

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Mei Lan Lie
aus Banjarmasin/Indonesien

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin der
Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer
Referentin: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt
Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 12.01.1979

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	4
II. Enzymatischer Abbau von Parathion	7
III. Problemstellung	19
IV. Eigene Untersuchungen	23
A. Darstellung der Methodik und des Materials	23
B. Versuchergebnisse	30
1. Präzision	30
2. Prüfung eines Einflusses von Natriumoxalat allein auf die Paraoxon-Spaltung	32
3. Ermittlung des Einflusses von Natriumoxalat auf die enzymatische Spaltung von Paraoxon durch menschliches Serum, gemessen nach Krisch	34
V. Diskussion und Zusammenfassung	43
VI. Literaturverzeichnis	44

I. EINLEITUNG

Die organischen Phosphorsäureverbindungen spielen wegen ihrer Toxizität in der Therapie kaum eine Rolle. Selten gilt es eine lokale Anwendung, z.B. wird E 600 (Paraoxon) in der Augenheilkunde als Mintacol (Miotisal) in hochgradiger Verdünnung bei Glaukom angewandt. Da sie aber sehr starke insektizide Wirkungen besitzen, haben sie weite Anwendung als Pflanzenschutzmittel oder Kontaktinsektizide gefunden.

Durch die ausgedehnte Verwendung organischer Phosphorsäureverbindungen als Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel vor allem in der Land- und Forstwirtschaft, aber auch im Haushalt treten infolge fahrlässiger Anwendungen oder aus suizidaler Absicht häufiger Vergiftungen auf.

In den letzten 20 Jahren hat vor allem das E 605 forensisch eine außerordentliche Bedeutung erhalten. Nach den ersten Pressemeldungen über E 605-Vergiftungsfälle war es für einige Jahre geradezu zum "Modegift" geworden, mit dem nicht nur massenhaft tödliche Unfälle und Suizide, sondern auch Morde geschehen sind.

Bei den Organophosphaten (Alkylphosphaten) wie E 605 (Parathion, O,O-Diäthyl-O-p-Nitrophenol-thiophosphat) handelt es sich um gut wirksame Kontakt-, Fraß- und Inhalationsgifte. Die Aufnahme der Stoffe ist per os über den Magendarmkanal, durch Inhalation und auch über die unverletzte Haut möglich.

Auch subkutane Injektionen sind beschrieben worden. Erkrankungen durch Inhalation von Sprühnebel der verdünnten Lösungen spielen eine Rolle als Arbeitsunfall.

Eine wichtige Voraussetzungen für die starke Wirkung ist die gute Fett- und Lipoidlöslichkeit.

Von den sehr zahlreichen Präparaten seien genannt: E 605 forte (Parathion), Gusathion, Metasystox-R, Endocide-R, Ultracid, Folimat, Phosdrin.

Durch diese Konzentrate, die für das Versprühen im Pflanzenschutz zu 0,1 bis 0,2 % igen Lösungen verdünnt werden sollen, sind schon sehr häufig Intoxikationen bei relativ geringen Dosen verursacht worden.

Die tödliche orale Dosis für Parathion wird mit 300- 500 mg (für Erwachsene) angegeben. Für einen Todeseintritt durch perkutane Aufnahme ist etwa die zehnfache Menge erforderlich (etwa 3 g).

Die Giftwirkung aller organischen Phosphorsäureverbindungen beruht prinzipiell auf dem gleichen Wirkungsmechanismus: sie blockieren mehr oder weniger stark und lange die Acetylcholinesterase (und andere Cholinesterasen) im Blut und in den Geweben, indem sie diese durch Phosphorylierung hemmen und somit den Abbau des körpereigenen Acetylcholin verhindern.

Die Symptome gehen daher auf die Anhäufung von Acetylcholin zurück. Dementsprechend finden sich am vegetativen Nervensystem Zeichen der muskarin- und der nikotinartigen Acetylcholinwirkung.

Die motorischen Endplatten haben einen Überschuß an Acetylcholin, und das Zentralnervensystem zeigt ebenfalls Symptome einer endogenen Acetylcholinvergiftung.

Zum klinischen Bild gehören je nach Schwere der Vergiftung: Übelkeit, Erbrechen, Durchfälle, Bradykardie, Schwindel, Miosis (auch postmortal), starker Speichelfluß, starke Bronchialsekretion, hochschmerzhafte Darmkoliken (evtl. spastischer Ileus), tonisch-klonische Krämpfe infolge Hirnödems, Kreislaufkollaps.

Der Vergiftungsverlauf ist bei Aufnahme von größeren Mengen oft foudroyant und endet nach wenigen Minuten mit dem Tod. Todesursache ist Atemstillstand durch zentrale Schädigung oder Bronchospasmus bzw. ein neuromuskulärer Block. Bei Aufnahme geringerer Mengen kann der Tod (ohne Therapie) auch nach Stunden eintreten.

Im allgemeinen treten die klinischen Erscheinungen erst auf, wenn die Serumcholinesterase um etwa 75 % gehemmt ist.

Somit gibt die Bestimmung der Serumcholinesterase-Aktivität ein gutes Maß für den Grad der Vergiftung oder der Exposition.

Die Herabsetzung der Cholinesteraseaktivität findet man auch in den Erythrozyten und im Gehirn, dort besonders im Corpus striatum.

Man muß allerdings wissen, daß in der Bevölkerung Personen mit genetisch sehr niedriger Serum-Cholinesterase zu finden sind. Diese kann sogar völlig fehlen (silent gene).

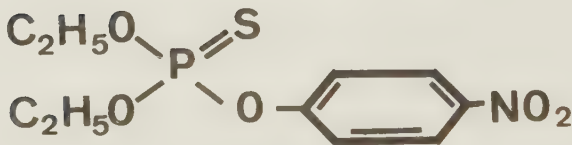
Zum Nachweis der Serum-Cholinesterase-Aktivität gibt es eine große Anzahl verschiedener Methoden, die nicht alle Acetylcholin als Substrat verwenden.

Der Nachweis der Alkylphosphate kann im Blut, im Urin, in den Organen, im Mageninhalt, hier oft auch noch nach Exhumierung, erfolgen.

II. ENZYMATISCHER ABBAU VON PARATHION

Der Organophosphorsäureester E 605 (Parathion) gehört zu den " ältesten " modernen Pflanzenschutzmitteln und hat nach wie vor erhebliche Bedeutung. Es handelt sich um O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-thiophosphat (Abb. 1).

Abb. 1



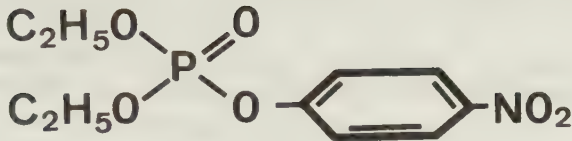
E 605 (PARATHION)

Der eigentliche Wirkstoff ist von gelbbrauner Farbe und riecht lauchartig.

In den Handelspräparaten wird er meist mit einer Schutzfarbe (blau) versehen.

Die 50 % ige Lösung wird als E 605 forte bezeichnet. Parathion (E 605) in den Handelspräparaten ist für den Warmblüter relativ untoxisch. Erst im Organismus wird der zweiwertige Schwefel durch ein Atom Sauerstoff ersetzt und damit entsteht der wirksame Cholinesterasehemmstoff, O,O-Diäthyl-O-p-nitrophenyl-phosphat, auch Paraoxon oder E 600 genannt.

Abb. 2



E 600 (PARAOXON)

Dieser Vorgang ist ein Beispiel für die sogenannte " Giftung " durch Stoffwechselfvorgänge.

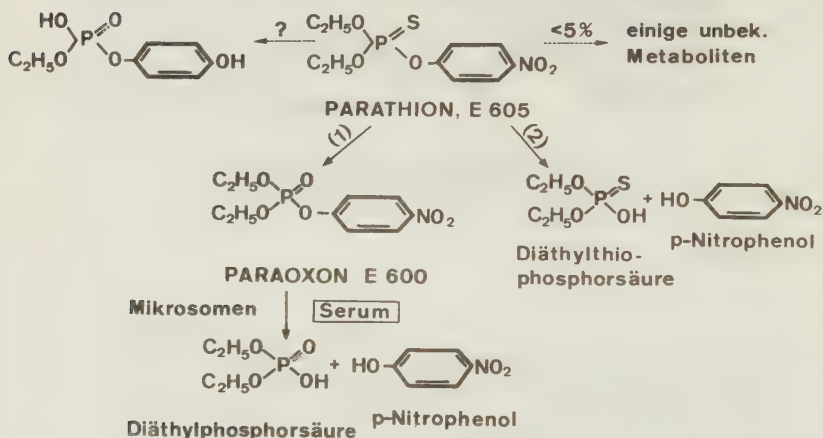
Man spricht grundsätzlich dann von Giftung, wenn erst im Körper die wirksame giftige Substanz entsteht. Häufiger ist allerdings, daß der Organismus durch Metabolisierung, Paarung mit Glukuronsäure eine bessere Wasserlöslichkeit und damit gleichzeitig eine Entgiftung von Stoffen erreicht.

NEAL (1971) und später POORE und NEAL (1972) haben den Stoffwechsel von Parathion bei Warmblüter und Mensch untersucht.

Die bisherigen bekannten Umsetzungen von Parathion sind in der folgenden Abbildung dargestellt (siehe Abb. 3):

Abb. 3

Stoffwechsel von PARATHION im Warmblüter



Der Stoffwechsel von Parathion beim Warmblüter findet sicher zu einem erheblichen Teil in der Leber statt.

Nach der Resorption wird Parathion in der Leber zu Paraoxon oxydiert.

Erst in dieser Form hemmt es die Cholinesterase.

Es wird dann durch Enzyme hydrolytisch gespalten.

Das freigesetzte p-Nitrophenol wird an Glukuronsäure gekoppelt und im Harn ausgeschieden.

Die Freisetzung von p-Nitrophenol wird in Blut und Harn nachweisbar.

Ein weiterer Weg ist die Abspaltung einer Äthylgruppe.

Früher wurden die Enzyme des Serums " Allgemeine Esterasen " genannt..

RICHTER und CROFT (1942) bezeichneten die " Allgemeinen Esterasen " als " Ali-Esterasen ". Erstmals erkannten ADAMS und WHITTAKER (1949) sowie MYERS und MENDEL (1949), daß Ali-Esterasen aus zwei verschiedenen Typen von Esterasen bestehen.

ALDRIDGE (1953 a) charakterisierte diese Enzyme etwas genauer und fand zwei Typen von Serum-Esterasen, die p-Nitrophenylacetat, -propionat und -butyrat spalten.

Er teilte sie hinsichtlich ihrer Hemmbarkeit durch E 600 in A- und B- Esterasen ein.

Das Enzym, welches durch organische Phosphorsäureester (Paraoxon) nicht gehemmt wird, nannte er A-Esterase, das andere, gegen Paraoxon empfindliche Enzym B-Esterase.

Der Begriff " Ali-Esterase " wird seit MOUNTER und WHITTAKER (1953) nur noch für die B-Esterase verwendet, während die A-Esterase aromatische Esterase genannt wird, da dieses Enzym Phenolester spaltet und Phenole substituiert.

Von da an ist A-Esterase ein Synonym für aromatische Esterase.

ALDRIDGE (1953 b) (weitere Literatur bei GELDMACHER-v.MALLINCKRODT u. Mitarbeitern 1973 b) konnte aber zeigen, daß das Serum vieler Warmblüter ein Ferment enthält, das in der Lage ist, Paraoxon hydrolytisch abzubauen.

Seitdem erscheint der Begriff " Paraoxonase ".

Nach ALDRIDGE (1953 b) ist die E 600 spaltende Aktivität des Serums (Paraoxonase) mit der aromatische Ester (wie z.B. p-Nitrophenyl-acetat) hydrolysierenden sogenannten A-Esterase indentisch.

MAIN (1960 a+b) bezweifelt aber diese Indentität und stellte fest, daß gereinigte Paraoxonase aus Schafserum Phenylacetat nicht hydrolysiert, während Schafserum, das A-Esterase enthält, dieses rasch hydrolysiert.

Die Aktivität, die Paraoxon hydrolysiert, nannte er ebenfalls Paraoxonase, verwendet diesen Begriff jedoch nicht als Synonym, sondern zur Unterscheidung von anderen A-Esterasen.

Das Begriff " Arylesterase " wurde von AUGUSTINSSON und CASIDA (1959) erstmals eingeführt, nachdem sie berichteten, daß die A-Esterase außer den Phenylestern auch die Acetate von α - und β -Naphthol und Indoxyl hydrolysiert, nicht aber aliphatische Ester und Cholinester.

In einer weiteren Arbeit definierte AUGUSTINSSON (1964) die Arylesterase als einen für solche Esterasen gebräuchlichen Begriff, die vornehmlich aromatische Ester hydrolysieren, z.B. Ester von Phenol, Naphthol und Indol.

Solche Ester werden zwar von anderen Esterasen hydrolysiert, aber die Hydrolyserate ist in diesen Fällen viel niedriger.

Außerdem unterscheiden chemische und physikochemische Eigenschaften die Arylesterase von anderen Esterase-Typen.

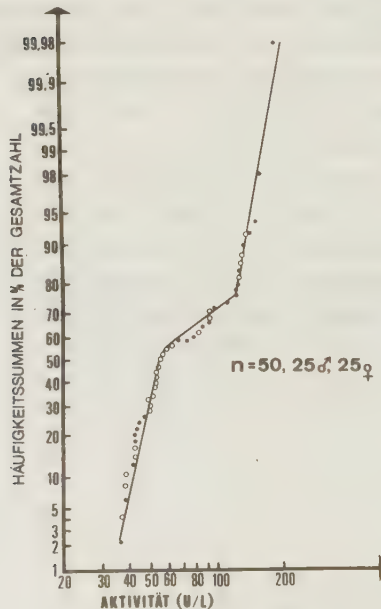
In der gültigen Enzymnomenklatur (1972) findet sich hierfür als empfehlenswerter Name die Bezeichnung Arylester-Hydrolase, Arylesterase, EC 3.1.1.2.

Als wesentliche Reaktion wird diesem Enzym die Hydrolyse von Phenylacetat in Phenol und Acetat zugeschrieben. Zur Spezifität wird festgestellt, daß dieses Enzym bei vielen Phenolestern wirkt, das Enzym aus Schafserum hydrolysiert auch Paraoxon.

Das Enzym EC 3.1.1.2 schien danach äußerst unspezifisch zu sein, umso mehr, als ihm auch noch die Hydrolyse von DFP (Di-isopropyl-Fluor-phosphat), Tabun und TEPP (Tetraäthyl-pyrophosphat) zugeschrieben wurde (Lit. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT und Mitarbeiter 1973 b).

KRISCH (1968) stellte fest, daß das menschliche Serum in unterschiedlicher Weise in der Lage ist, Paraoxon hydrolytisch zu spalten. Mittels einer einfachen spektrometrischen Methode, die die Abspaltung von p-Nitrophenol aus Paraoxon mißt, konnte er bei 50 Personen, je 25 gesunden Männern und Frauen, zeigen, daß im pH-Optimum der enzymatischen Hydrolyse von Paraoxon (pH 11,2) Personen mit unterschiedlichen Enzymaktivitäten im Bereich von etwa 30 bis 200 U/l vorhanden sind (siehe Abb. 4).

Abb. 4: Normalwerte der E 600-spaltenden Aktivität im Serum, gemessen mit einer einfachen spektrometrischen Methode nach KRISCH (1968)



Die Werte wurden zur Ermittlung des Verteilungstyps in einem Wahrscheinlichkeitsnetz (Abzisse logarithmisch, Ordinate nach dem Gausschen Integral geteilt) aufgetragen (KRISCH 1968).

Aufgrund dieser Ergebnisse hat KRISCH (1968) hinsichtlich der Serum-Paraoxonase-Aktivität die Normalpersonen in zwei sich überlagernde Gruppen eingeteilt.

Dabei handelt sich es um logarithmisch normale Verteilungen. Die prozentuale Verteilung auf die beiden Gruppen ist bei Männern und Frauen fast gleich. Geschlechtsunterschiede in der Fermentaktivität wurden bei den Untersuchungen an 50 Personen beiderlei Geschlechts nicht bemerkt.

KRISCH (1968) konnte mit diesem Verfahren im Einzelfall wegen des großen Überlagerungsbe- reiches oft nicht sicher unterscheiden, zu welcher der beiden Gruppen eine Versuchsperson gehört.

Mehrere Autoren haben die Untersuchungen an größeren Kollektiven weitergeführt und gefunden, daß noch sehr viel höhere Aktivitäten bis 500 U/l vorkommen.

GELDMACHER-v.MALLINCKRODT u. Mitarbeiter (1973 a) nahmen an, daß die gefundenen Aktivitäten nicht das Bild einer bimodalen Verteilung zeigen, sondern ein Polymorphismus mit drei Aktivitätsgruppen vorliegt.

Familienuntersuchungen an 100 Familien mit 180 Kindern wiesen darauf hin, daß dieser Polymorphismus genetisch bedingt ist, und möglicherweise einem intermediären Erbgang folgt (GELDMACHER-v.MALLINCKRODT u. Mitarbeiter 1973 a, DUMBACH 1976). Dabei gelangte eine andere Methode, die Anti-ChE-Technik zur Anwendung.

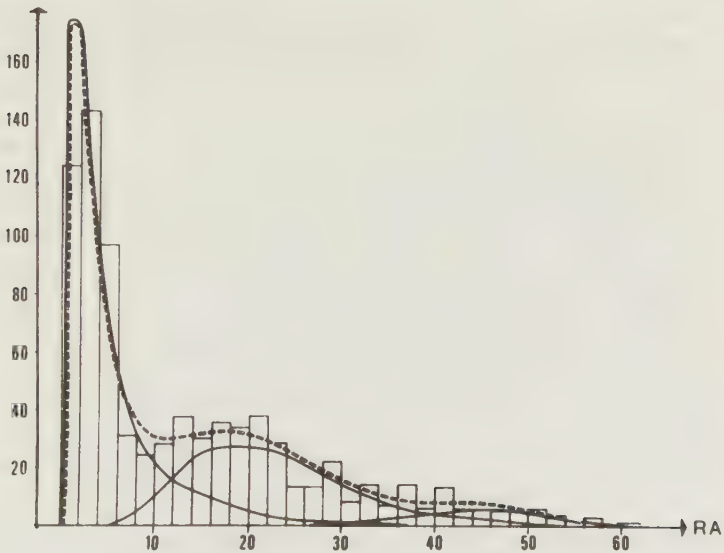
Wie oben gesagt wurde, ist mit dem einfachen spektrophotometrischen Verfahren von KRISCH (1968) über die p-Nitrophenolabspaltung nicht jedes Serum einer bestimmten Gruppe sicher zuzuordnen, weil zwischen den einzelnen Gruppen offenbar ein großer Überlagerungsbereich besteht.

Entsprechendes gilt bei einem großen Kollektiv für die Anti-ChE-Technik (GELDMACHER-v.MALLINCKRODT u. Mitarbeiter 1973 b, DUMBACH 1976).

Die Verteilung gewonnen mit der Anti-ChE-Technik ist in Abb.5 dargestellt.

Abb. 5: Polymorphismus der menschlichen
Serum-Paraoxonase-Aktivität,
gemessen mit der Anti-ChE-Technik in der
Warburgapparatur bei 799 nicht
blutsverwandten Personen
(DUMBACH 1976).

Anzahl d. Personen



RA = Restaktivität

DUMBACH (1976) hat mit dieser Technik die Verteilung der drei Serumparaoxonase-Aktivitätsgruppen in der Bevölkerung überprüft und gefunden, daß ungefähr 60 % Paraoxon im Serum relativ langsam abbaut, und es 34 % mit mittlerer, 6 % mit hoher Geschwindigkeit hydrolysieren.

Aus allen diesen Untersuchungen geht hervor, daß auch das Serum einen wesentlichen Anteil an den Entgiftungsprozessen des Paraoxons hat.

Dieser Anteil kann aber genetisch bedingt unterschiedlich sein.

In der Bevölkerung finden sich neben Personen mit mittlerer und hoher Serum Paraoxonase-Aktivität, etwa zur Hälfte solche mit vergleichsweise sehr niedriger Serum - Paraoxonase-Aktivität, die beim Umgang mit Parathion (E 605) gefährdeter sind.

Es wäre hier zu denken besonders an Personen, die E 605 (Parathion) in der Land- und Forstwirtschaft oder in den Heimgärten verwenden oder in der Produktion tätig sind.

Personen mit niedriger Serum Paraoxonase-Aktivität sollten deshalb bei entsprechender Tätigkeit besonders sorgfältig überwacht werden.

Dabei bedeutet eine hohe Serum-Paraoxonase-Aktivität aufgrund der Spezifität des Enzyms wahrscheinlich keinen Schutz gegen andere Alkylphosphate mit Ausnahme von Methyl- E 605 und Chlorthion (GELDMACHER-v.MALLINCKRODT u. Mitarbeiter 1973 b, FLÜGEL u. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT 1978).

III. PROBLEMSTELLUNG

Die bis heute bekannte Gruppeneinteilung der menschlichen Serum-Paraoxonase erfolgte aufgrund quantitativ bestimmter Aktivitätsunterschiede.

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Suche nach einem einfachen Test, welcher für die verschiedenen genetisch bedingten Paraoxonasetypen eine rasche qualitative Unterscheidung ermöglicht. Genetische Studien hatten für die menschliche Serum-Cholinesterase gezeigt, daß die sehr seltenen Personen mit idiopathischem Pseudocholinesterasemangel homozygot für ein autosomal rezessives Gen sind.

In den meisten Populationen hat diese Gen eine Frequenz von 0,019 und eine Inzidenz von etwa 1 auf 2800.

KILLOW und Mitarbeiter (1957 a) haben in ihrer ersten Studie berichtet, daß dieses atypische Gen (als E^a_1 bezeichnet) die Synthese eines Enzyms mit niedriger Aktivität, aber mit einer erhöhten Resistenz gegen Inhibition durch Verbindungen wie z.B. das Lokalanaesthetikum Dibukain induziert.

In einer weiteren Studie entwickelten KILOW u. Mitarbeiter (1957 b) eine Klassifikationsmethode der Serum-Cholinesterasen, basierend auf der Inhibition der Benzoylcholinhydrolyse durch Dibukain.

Mittels Bestimmung des Prozentsatzes der Inhibition (Dibukainnummer) konnten sie die Population in drei Phänotypen aufteilen.

Ungefähr 97 % von den mit dieser Methode getesteten Personen haben einem normalen Genotypus ($E_1^u E_1^u$) mit einer normalen Dibukainnummer von 76 - 81.

Ungefähr 3 % gehörten zu der heterozygoten Zwischengruppe ($E_1^u E_1^a$) mit einer Dibukainnummer von 55 bis 69.

Diese Gruppe kann einen leichten Anstieg der Succinylcholinempfindlichkeit zeigen.

Eine sehr geringe Anzahl gehört zu der atypischen homozygoten Gruppe $E_1^a E_1^a$ mit einer Dibukainnummer unter 21, einer niedrigen Pseudocholinesterase-Aktivität und einer starken Empfindlichkeit gegen Succinylcholin.

HARRIS und WHITTAKER (1961) haben berichtet, daß auch Natriumfluorid als Inhibitor der Serumcholinesterase benutzt werden kann und eine gute Unterscheidung der Phänotypen ermöglicht.

In ihrer Studie haben HARRIS und WHITTAKER (1961) festgestellt, daß in einigen wenigen Fällen die gemessene Fluoridnummer wesentlich kleiner war als die korrespondierende Dibukainnummer.

Aus dieser Tatsache schloßen sie auf die Existenz eines dritten Allels.

Obwohl dieses Gen eine niedrigere Frequenz als das bereits bekannte atypische Allel hat, wurden einige Versuchspersonen gefunden, die homozygot oder heterozygot hierfür waren.

KIMONYO (1978) hat geprüft, ob eine Gruppeneinteilung der Serum-Paraoxonase durch unterschiedliche Hemmung mittels Natriumfluorid möglich ist.

In ihrer Arbeit hat sie gezeigt, daß Natriumfluorid in Glycin-Natronlauge-Puffer (pH 11,2) in Konzentrationen ab 10^{-3} molar in der Lage ist, eine von der Natriumfluorid-Konzentration abhängige Spaltung von Paraoxon zu bewirken.

Dieser Effekt konnte nur als Katalyse gedeutet werden. Ohne Zusatz von Natriumfluorid in entsprechender Konzentration ist Paraoxon unter den angegebenen Bedingungen stabil, wie auch KRISCH (1968) zeigte.

KIMONYO (1978) zeigte weiter, daß Natriumfluorid unter Berücksichtigung der durch Natriumfluorid allein bewirkten Spaltung eine hemmende Wirkung auf die Paraoxon-Spaltung durch die Serum-Paraoxonase ausübt.

Ein unterschiedlicher Einfluß auf Vertreter der niedrigen und mittleren Aktivitätsgruppe ist nicht erkennbar.

Für die hohe Aktivitätsgruppe könnte eine offensichtlich vorliegende Enzymhemmung schon ab 10^{-2} molar Natriumfluorid ein brauchbares Differenzierungsmerkmal sein.

Die Ergebnisse von KIMONYO ergaben insgesamt keine Möglichkeit, sicher zwischen den drei Serumparaoxonase-Gruppen zu unterscheiden. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit geprüft werden, ob Natriumoxalat ein geeigneter Hemmstoff für eine Differenzierung ist.

IV. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. Darstellung der Methodik und des Materials

Methodik

Es handelt sich um einen einfachen, kontinuierlichen photometrischen Test zur Messung der enzymatischen Hydrolyse von Paraoxon durch menschliches Serum von KRISCH (1968), wobei die Extinktion von p-Nitrophenol bei 405 nm photometrisch direkt in der Küvette gemessen wird und das Ausmaß der Abspaltung von p-Nitrophenol in der Zeiteinheit als Maß für die Paraoxonaseaktivität dient.

Standard-Test

Lösungen

- 0,1 M Glycin-Natronlauge-Puffer (pH 11,2)

7,507 g Glycin abwiegen, etwa 900 ml dest. Wasser zugeben.

Solange mit dem Magnetrührer rühren, bis alles gelöst ist.

Unter ständigem Rühren einige Tropfen 35 % ige Natronlauge zugeben, bis-mit pH-Meter geprüft- ein pH-Wert von 11,2 eingestellt ist.

Dann die Lösung mit dest. Wasser auf 1000 ml auffüllen.

- Trispuffer (pH 8,0)

12,114 g TRIS (=Tris-hydroxymethyl-amino-methan) abwiegen, etwa 900 ml dest. Wasser zugeben.

Solange mit dem Magnetrührer rühren, bis alles TRIS gelöst ist.

Unter ständigem Rühren einige Tropfen 37 % HCl zugeben, bis- mit pH-Meter geprüft-eine pH-Wert von 8,0 eingestellt ist.

Dann wird die Lösung mit dest. Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

- E 600-Stammlösung

($1,2 \cdot 10^{-2}$ M in 0,1 M Trispuffer pH 8,0)

0,26 ml E 600 (Paraoxon) in 100 ml Trispuffer (pH 8,0) geben, durch etwa 5 - 10 Minuten mechanisches Schütteln (Mischgerät) mischen.

- E 600-Gebrauchslösung

Die E 600-Stammlösung wird zum Gebrauch jeweils 1 : 5 mit dest. Wasser verdünnt,

z.B. 10 ml E 600-Stammlösung +
40 ml dest. Wasser.

- Serum

Serum ist aus normalem Venenblut gewonnen.

Für die Bestimmung wurde es 1 : 5 mit 0,9 %-iger Kochsalzlösung verdünnt,

z.B. 1 ml Serum + 4 ml 0,9 % ige Kochsalzlösung

Die Lösungen in entsprechenden Mengen (z.B je 3,3 ml Glycin-Natronlauge-Puffer pH 11,2) wurden in Reagenzgläser im Wasserbad auf 25° C gebracht.

- Ansatz

In ein Reagenzglas werden pipettiert:

- 3,3 ml Glycin-Natronlauge-Puffer
(pH 11,2)
- 0,5 ml 1 : 5 verd. Serum
- 1,0 ml E 600-Gebrauchslösung

Nach Durchmischen wird ein Anteil der Lösung in eine Küvette (Schichtdicke 1 cm) eingegossen.

Messung

Nach Durchmischen mit einem unten abgeflachten Glasstab wird in Abständen von 30 Sekunden die Extinktion bei 405 nm und $t = 25^{\circ}$ am Photometer abgelesen.

Ausgewertet wird die Extinktionsdifferenz 180 s minus 30 s.

Vom Messwert wird der unter entsprechenden Bedingungen gemessene Leerwert (ohne Serum; statt Serum 0,9%-ige Kochsalzlösung) abgezogen.

Berechnung

Zur Umrechnung der Extinktionsdifferenzen in nMol wird der molare Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol (in Glycin-NaOH-Puffer pH 11,2) bei 405 nm = $18,05 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{Mol}^{-1}$ zugrunde gelegt.

10 nMol p-Nitrophenol gelöst in 1 ml hätten danach bei $d = 1 \text{ cm}$ und $\lambda = 405 \text{ nm}$ eine Extinktion von 0,1805.

Unter weiterer Berücksichtigung der Serumverdünnung (Umrechnung auf ml Serum durch Multiplikation mit 10), der Meßzeit (Umrechnung auf 1 Min. durch Division durch 2,5) und des Ansatzvolumens (=4,8 ml. Multiplikation mit 4,8) errechnet sich die Aktivität nach folgender Formel:

$$\text{Aktivität} = \frac{\Delta E \cdot 10 \cdot 4,8 \cdot 10}{0,1805 \cdot 2,5}$$

$$= \Delta E \cdot 1063 \quad (\text{U/l})$$

Photometrischer Test zu Ermittlung des Einflusses von Natriumoxalat auf die enzymatische Spaltung von E 600 durch Serum nach KRISCH (1968):

Lösungen

- Natriumoxalat in Glycin-NaOH-Puffer (pH 11,2)

Natriumoxalat:	Formel	$\begin{array}{c} \text{C-OO-Na} \\ \\ \text{C-OO-Na} \end{array}$	M= 134
----------------	--------	--	--------

Es wurden Glycin-NaOH-Puffer-Lösungen (pH 11,2) mit unterschiedlicher Natriumoxalat-Konzentration hergestellt:

- 1 M Natriumoxalat entspricht 134 g Na-Oxalat in 1000 ml Glycin-NaOH-Puffer (pH 11,2) oder 13,4 g Na-Oxalat in 100 ml Glycin-NaOH-Puffer (pH 11,2)
- 10^{-1} M Na-Oxalat entspricht 1,34 g Na-Oxalat in 100 ml Glycin-NaOH-Puffer (pH 11,2)
- 10^{-2} M Natriumoxalat entspricht 10 ml 10^{-1} M Na-Oxalat ad 100 ml mit Glycin-NaOH-Puffer (pH 11,2)
- 10^{-3} M Na-Oxalat entspricht 10 ml 10^{-2} M Na-Oxalat ad 100 ml mit Glycin-NaOH-Puffer (pH 11,2)
- 10^{-4} M Na-Oxalat entspricht 10 ml 10^{-3} M Na-Oxalat ad 100 ml mit Glycin-NaOH-Puffer (pH 11,2)
- 10^{-5} M Na-Oxalat entspricht 10 ml 10^{-4} M Na-Oxalat ad 100 ml mit Glycin-NaOH-Puffer (pH 11,2)

Der pH-Wert aller Lösungen wurde nach Oxalatzusatz noch einmal kontrolliert. Er betrug stets 11,2.

- E 600-Stammlösung

($1,2 \cdot 10^{-2}$ M in 0,1 M Trispuffer pH 8,0)

0,26 ml E 600 in 100 ml Trispuffer
(pH 8,0) geben, durch etwa 5 -10
Minuten mechanisches Schütteln
(Mischgerät) mischen.

- E 600-Gebrauchslösung

Die E 600-Stammlösung wird zum
Gebrauch jeweils 1 : 5 mit dest.
Wasser verdünnt,
z.B. 10 ml E 600-Stammlösung +
40 ml dest. Wasser.

- Serum

Serum ist aus normalem Venenblut
gewonnen.

Für die Bestimmung wurde es 1 : 5
mit 0,9 %-iger Kochsalzlösung
verdünnt,

z.B. 1 ml Serum + 4 ml 0,9 %-ige
Kochsalzlösung.

Die Lösungen in entsprechenden Mengen (z.B.
je 3,3 ml Glycin-NaOH-Puffer mit unterschied-
licher Natriumoxalat-Konzentration) wurden in
Reagenzgläser im Wasserbad auf 25° C
gebracht.

Ansatz

In ein Reagenzglas werden pipettiert:

- 3,3 ml Glycin-NaOH-Puffer mit
unterschiedlicher Natriumoxalat-
Konzentration (pH 11,2)
- 0,5 ml 1:5 verd. Serum
- 1,0 ml E 600-Gebrauchslösung

Nach Durchmischen wird ein Anteil der Lösung in eine Küvette (Schichtdicke 1 cm) eingegossen.

Messung

Die Messungen werden unter gleichen Bedingungen wie oben beschrieben, durchgeführt.

Berechnung

Die Berechnung der Aktivität erfolgt nach der Formel:

$$\text{Aktivität} = \Delta E \cdot 1063 \quad \text{U/l}$$

B. Versuchsergebnisse

1. Präzision

Zunächst wurde die Präzision des in dem Abschnitt " Methodik " angegebenen **Verfahrens** bestimmt.

Es wurde für ein Serum mit einer Paraoxonase-Aktivität von 74 U/l zehn Mal die Aktivität gemessen, und dann die Standardabweichung (s) und der Variationskoeffizient (VK) bestimmt.

Die Ergebnisse der Messungen der Paraoxonase-Aktivität zur Ermittlung der Präzision sind in Tab. 1 wieder- gegeben.

Tabelle 1: Ermittlung der Präzision für die Messung der enzymatischen Spaltung von Paraoxon durch Serum nach KRISCH (1968).

Extinktion E nach		ΔE	Aktivität
30 s	180 s		U/l
0,22	0,29	0,07	74
0,21	0,28	0,07	74
0,22	0,29	0,07	74
0,21	0,28	0,07	74
0,22	0,29	0,07	74
0,22	0,29	0,07	74
0,21	0,285	0,075	79
0,22	0,29	0,07	74
0,21	0,28	0,07	74
0,21	0,28	0,07	74

aus den gefundenen Werten berechnet man

$$\begin{aligned}\text{Mittelwert:} \quad \bar{x} &= \frac{\sum x_i}{n} \\ &= 74\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Standardabweichung:} \quad s &= \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \\ &= 1,6\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Variationskoeffizient: } VK &= \frac{s \cdot 100}{\bar{x}} \% \\ &= 2,1 \%\end{aligned}$$

Bei einer 10-fach-Bestimmung des gleichen Serums wurde ein Mittelwert von $74 \pm 1,6$ U/l gefunden.

Die Standardabweichung (s) beträgt 1,6.

Da die Standardabweichung von der Größe des Mittelwerts abhängt, sind die errechneten Werte bei den verschiedenen Analysenverfahren nicht vergleichbar.

Eine vergleichende Aussage erlaubt die relative Standardabweichung (auch als Variationskoeffizient VK bezeichnet), bei der die Standardabweichung in Relation zum Mittelwert angegeben wird.

Der Variationskoeffizient (VK) errechnet sich daraus zu 2,1 %. Der methodische Fehler ist im Vergleich zur individuellen biologischen Streuung der Aktivitäten nur gering.

2. Prüfung eines Einflusses von Natriumoxalat allein auf die Paraoxon-Spaltung

Hierbei wurde unter gleichen Bedingungen wie in "Methódik" beschrieben die Abspaltung von p-Nitrophenol aus Paraoxon gemessen mit dem Unterschied, daß anstelle der Serumverdünnung eine entsprechende Menge physiologische Kochsalzlösung im Ansatz verwendet wurde.

Hierdurch konnte geprüft werden, ob allein die Zugabe von Natriumoxalat in verschiedenen Konzentrationen im Ansatz einen Einfluß auf die Hydrolyse hat.

Zum Vergleich dienten Ansätze mit Glycin-Natronlauge-Puffer ohne Zusatz von Natriumoxalat, wobei gleichfalls statt Serum 0,9% ige Kochsalzlösung im Ansatz enthalten war.

Die Ergebnisse sind in Tab. 2 und 3 wiedergegeben.

Tabelle 2: Eigenhydrolyse von Paraoxon
im Ansatz nach KRISCH (1968).

Glycin-NaOH-Puffer ohne Zusatz	Extinktion E nach		ΔE
	30 s	180 s	
	0,19	0,205	0,015
	0,20	0,215	0,015
	0,20	0,215	0,015
	0,20	0,215	0,015
	0,22	0,235	0,015
	0,22	0,24	0,02
	0,20	0,215	0,015
	0,205	0,22	0,015
	0,20	0,22	0,02
	0,195	0,21	0,015

Tabelle 3: Einfluß von Natriumoxalat in
verschiedenen Konzentrationen auf
die Eigenhydrolyse von Paraoxon

Natriumoxalat-Konz. in Glycin-NaOH-Puffer (Mol/l)	Extinktion E nach		ΔE
	30 s	180 s	
10^{-5}	0,19	0,205	0,015
	0,20	0,215	0,015
	0,195	0,215	0,02
10^{-4}	0,20	0,215	0,015
	0,20	0,215	0,015
	0,21	0,225	0,015
10^{-3}	0,21	0,225	0,015
	0,21	0,225	0,015
	0,20	0,22	0,02
10^{-2}	0,20	0,215	0,015
	0,21	0,225	0,015
	0,21	0,225	0,015
10^{-1}	0,21	0,225	0,015
	0,22	0,235	0,015
	0,21	0,225	0,015

Wie aus Tab. 2 hervorgeht, ergeben sich aufgrund der Eigenhydrolyse von Paraoxon bei pH 11,2 ohne Serum nur niedrige Extinktionsdifferenzen (ΔE in 150 Sek. = 0,015), die rechnerisch bei der Ermittlung der in Tab. 4 wiedergegebenen Aktivitäten berücksichtigt werden.

Aus Tab. 3 erkennt man, daß die Zugabe von Natriumoxalat im Ansatz keinen Einfluß auf die nicht enzymatische Hydrolyse des E 600 hat.

3. Ermittlung des Einflusses von Natriumoxalat auf die enzymatische Spaltung von Paraoxon durch menschliches Serum, gemessen nach KRISCH (1968)

Die Untersuchungen wurden bei insgesamt 15 Personen mit verschiedenen Serum Paraoxonase-Aktivitäten durchgeführt, und zwar bei 5 Personen mit niedriger Aktivität
 5 Personen mit mittlerer Aktivität
 5 Personen mit hoher Aktivität

Die Zuordnung der Seren erfolgte dabei entsprechend GELDMACHER-v. MALLINCKRODT u. Mitarbeitern (1973:a):

niedriger Typ	30 - 190 U/l
mittlerer Typ	190 - 350 U/l
hoher Typ	über 350 U/l

Bei je 5 Versuchspersonen für jede Gruppe hatten wir die in Tab. 4 aufgeführten Ergebnisse.

Tabelle 4: Einfluß von Natriumoxalat auf die Aktivität der menschlichen Serum-Paraoxonase.

Natriumoxalat-Konz. in Glycin-NaOH-Puffer (Mol/l)	Enzymaktivität in Prozent der Ausgangs- aktivität
---	---

a) niedriger Typ

1. Lie, Mei Lan	31 J.	Aktivität 74 U/l
10^{-5}	74	100
10^{-4}	74	100
10^{-3}	74	100
10^{-2}	72	97
10^{-1}	67	90

Natriumoxalat-Konz. in Glycin-NaOH-Puffer (Mol/l)	Enzymaktivität in Prozent der Ausgangs- aktivität	U/l
---	---	-----

2. Krüger, Andrea 19 J. Aktivität 138 U/l

10^{-5}	138	100
10^{-4}	138	100
10^{-3}	138	100
10^{-2}	132	95
10^{-1}	117	84

3. Ziegler, Margarete 23 J. Aktivität 159 U/l

10^{-5}	159	100
10^{-4}	159	100
10^{-3}	157	98
10^{-2}	148	93
10^{-1}	118	74

4. Schaidt, Gerd 55 J. Aktivität 127 U/l

10^{-5}	127	100
10^{-4}	127	100
10^{-3}	127	100
10^{-2}	122	96
10^{-1}	109	86

Natriumoxalat-Konz. in Glycin-NaOH-Puffer (Mol/l)	Enzymaktivität in Prozent der Ausgangs- aktivität	
	U/l	

5. Opitz, Otto 56 J. Aktivität 164 U/l

10^{-5}	164	100
10^{-4}	164	100
10^{-3}	162	98
10^{-2}	151	92
10^{-1}	121	73

b) mittlerer Typ

1. Bohnsack, Edda 17 J. Aktivität 290 U/l

10^{-5}	290	100
10^{-4}	290	100
10^{-3}	287	98
10^{-2}	247	85
10^{-1}	117	40

2. Ahnert, Andreas 23 J. Aktivität 223 U/l

10^{-5}	223	100
10^{-4}	223	100
10^{-3}	221	99
10^{-2}	191	85
10^{-1}	111	49

Natriumoxalat-Konz. in Glycin-NaOH-Puffer (Mol/l)	Enzymaktivität in Prozent der Ausgangs- aktivität U/l
---	--

3. Oshima, Joko	27 J.	Aktivität 265 U/l
-----------------	-------	-------------------

10^{-5}	265	100
10^{-4}	265	100
10^{-3}	263	99
10^{-2}	226	85
10^{-1}	116	43

4. Machbert, Günther	43 J.	Aktivität 329 U/l
----------------------	-------	-------------------

10^{-5}	329	100
10^{-4}	329	100
10^{-3}	323	98
10^{-2}	277	84
10^{-1}	120	36

5. Machbert, Josephine	64 J.	Aktivität 249 U/l
------------------------	-------	-------------------

10^{-5}	249	100
10^{-4}	247	99
10^{-3}	244	98
10^{-2}	218	85
10^{-1}	114	45

Natriumoxalat-Konz. in Glycin-NaOH-Puffer (Mol/l)	Enzymaktivität in Prozent der Ausgangs- aktivität	
	U/l	

c) hoher Typ

1. Kimonyo, Jeanne 29 J. Aktivität 361 U/l

10^{-5}	361	100
10^{-4}	361	100
10^{-3}	358	99
10^{-2}	304	84
10^{-1}	116	32

2. Tsuchihashi, Mari 30 J. Aktivität 372 U/l

10^{-5}	372	100
10^{-4}	372	100
10^{-3}	368	98
10^{-2}	317	85
10^{-1}	120	32

3. Bohnsack, Achmed 23 J. Aktivität 393 U/l

10^{-5}	391	99
10^{-4}	391	99
10^{-3}	388	98
10^{-2}	331	84
10^{-1}	122	31

Natriumoxalat-Konz. in Glycin-NaOH-Puffer (Mol/l)	Enzymaktivität in Prozent der Ausgangs- aktivität
U/l	

4. Saiki, Toshijuki 25 J. Aktivität 356 U/l

10^{-5}	356	100
10^{-4}	356	100
10^{-3}	354	99
10^{-2}	301	84
10^{-1}	116	32

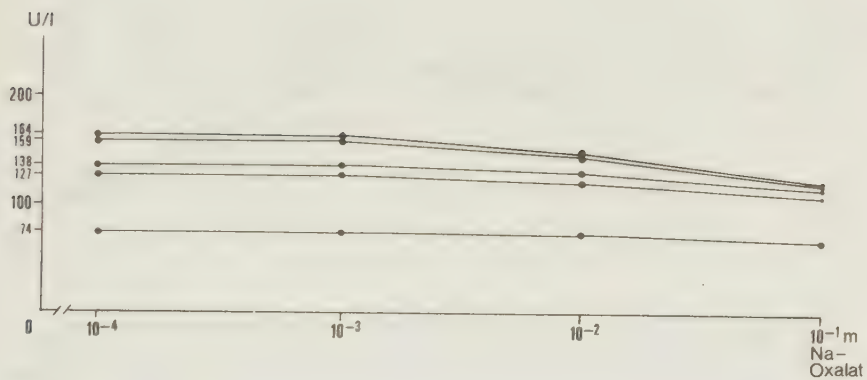
5. Geldmacher, Herbert 62 J. Aktivität 478 U/l

10^{-5}	478	100
10^{-4}	475	99
10^{-3}	472	98
10^{-2}	402	84
10^{-1}	149	31

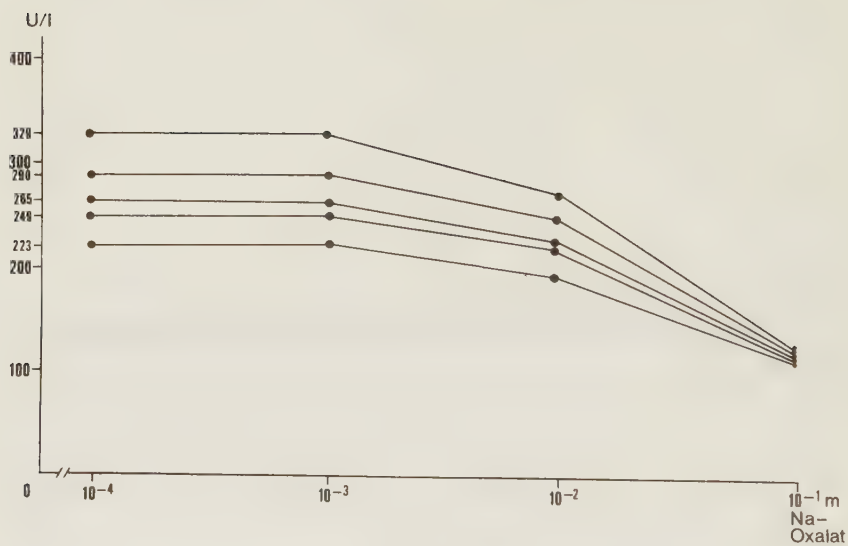
Die in Tab. 4 genannten Werte sind in Abb. 6 a - c graphisch dargestellt.

Abb. 6: Hemmung der Serum-Paraoxonase-Aktivität
durch Natriumoxalat

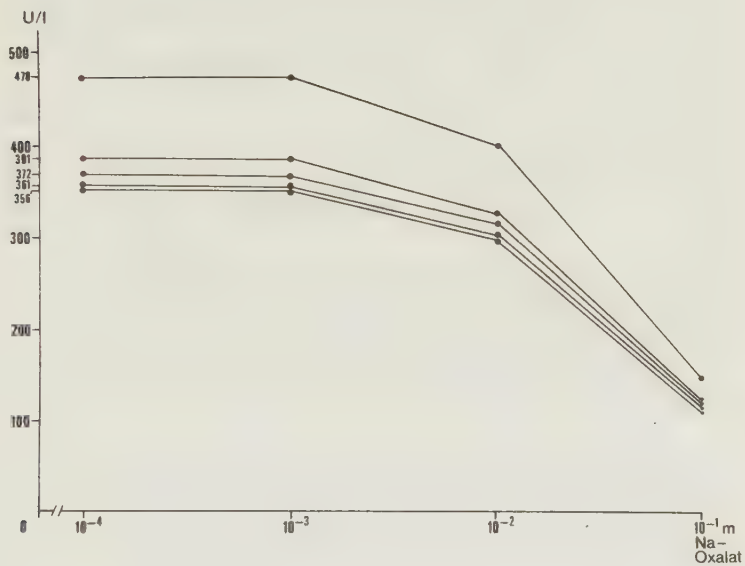
a) niedrige Paraoxonase-Aktivität



b) mittlere Paraoxonase-Aktivität



c) hohe Paraoxonase-Aktivität



V. DISKUSSION und ZUSAMMENFASSUNG

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß unter den Bedingungen der Bestimmung der Paraoxonase-Aktivität nach KRISCH (1968) Natriumoxalat in Glycin-Natronlauge-Puffer in Konzentrationen bis 10^{-3} M keinen Einfluß auf die Enzymaktivität hat.

Bei Natriumoxalat-Konzentrationen, die höher als 10^{-3} M sind, tritt eine Hemmung des Enzyms ein.

Diese ist bei der niedrigen Aktivitätsgruppe am geringsten und liegt zwischen 10 % und 27 %.

Bei der mittleren Aktivitätsgruppe beträgt die Hemmung zwischen 51 % und 64 %, in der hohen Aktivitätsgruppe 68-69 %.

Die Hemmung dürfte darauf zurückzuführen sein, daß Oxalat Calcium bindet, welches für die Wirksamkeit von Paraoxonase wichtig ist. Eine Differenzierung der drei Paraoxonase-Typen durch Natriumoxalat ist nicht sicherer möglich als durch Bestimmung der Ausgangsaktivität ohne Natriumoxalatzusatz.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. ADAMS, D.H., WHITTAKER V.P.:
The characterization of the esterases of human plasma. *Biochem. J.* 44, 62-70 (1949)
2. ALDRIDGE, W.N.:
Serum esterases. 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenylacetate,-propionate and -butyrate, and a method for their determination. *Biochem. J.* 53, 110-117 (1953 a)
3. ALDRIDGE, W.N.:
Serum esterases. 2. An enzyme, hydrolysing diethyl p-nitrophenylphosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochem. J.* 53, 117-124 (1953 b)
4. AUGUSTINSSON, K.B., CASIDA, J.E.:
Enzymic hydrolysis of N:N-Dimethylcarbamoylfluoride
Biochem. Pharmacol. 3, 60-67 (1959)
5. AUGUSTINSSON, K.B.:
Arylesterases
J. Histochem. Cytochem. 12, 744-747 (1964)
6. DUMBACH, J.:
Statische Analyse zu Genetik der menschlichen Serumparaoxonase (EC 3.1.1.2)
Dissertation Erlangen 1976

7. Enzyme Nomenclature:
Recommendations (1972) of the International Union
of Pure and Applied Chemistry and the Interna-
tional Union of Biochemistry
Elsevier, Amsterdam (1973)
8. FLÜGEL, M., GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M.:
Zur Kinetik des Paraaxon-spaltenden Enzyms
im menschlichen Serum (EC 3.1.1.2)
Klin. Wochenschr. 56, 911-916 (1978)
9. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M., LINDORF, H.H.,
PETENYI, M., FLÜGEL, M., FISCHER, Th., HILLER, Th.
Genetisch determinierter Polymorphismus der
menschlichen Serum-Paraaxonase (EC 3.1.1.2)
Humangenetik 17, 331 (1973 a)
10. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M., PETENYI, M.,
METZNER, H., BURGIS, H., DIETZEL, B., NIRSCHL, H.,
RENNER, O.:
Zur Spezifität der menschlichen Serum-Paraaxonase
Z. Physiol. Chem. 354, 337 (1973 b)
11. HARRIS, H., WHITTAKER, M.:
Differential Inhibition of human serum cholinesterase
with fluoride: Recognition of two new phenotypes
Nature 191, 496 (1961)
12. KALOW, W., STARON, N.:
On distribution and inheritance of atypical forms
of human serum cholinesterase as indicated by
dibukain numbers.
Can. J. Biochem. Physiol. 35, 1305 (1957 a)

13. KALOW, W., GENEST, K.:
A method for the determination of atypical forms
of human serum cholinesterase.
Determination of dibucain numbers.
Can. J. Biochem. physiol. 35, 1305 (1957 b)
14. KIMONYO, J:
Einfluß von Natriumfluorid auf die hydrolytische
und enzymatische Spaltung von Paraoxon
(E-600, O,O-Diäthyl-O-p-nitrophenyl-phosphat)
Dissertation Erlangen 1978
15. KRISCH, K.:
Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenyl-
phosphat durch menschliches Serum
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 6, 41 (1968)
16. MAIN, A.R.:
The purification of the enzyme hydrolysing diethyl
p-nitrophenyl phosphate (Paraoxon) in sheep
serum
Biochem. J. 74, 10-20 (1960 a)
17. MAIN, A.R.:
The differentiation of the A-type esterases in
sheep serum
Biochem. J. 75, 188-195 (1960 b)
18. MOUNTER, L.A., WHITTAKER, V.P.:
The hydrolysis of esters of phenol by cholines-
terases and other esterases
Biochem. J. 54, 551-559 (1953)

19. MYERS, D.K., MENDEL, B.:
Investigations on the use of eserine for the
differentiation of mammalian esterases
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 71, 357-360 (1949)
20. NEAL, R.A.:
Enzymic mechanism of metabolism of the phos-
phorothioate insecticides
Arch. Intern. Med. 128, 118 (1971)
21. POORE, R.E., NEAL, R.A.:
Evidence for extrahepatic metabolism of
parathion.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 23, 759 (1972)
22. RICHTER, D., CROFT, P.G.: Blood esterases
Biochem. J. 36, 746-757 (1942)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Frau Professor Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt für die Überlassung des Themas, ihre außergewöhnlich große Hilfsbereitschaft und den zu jeder Zeit so freundlich erteilten Rat recht herzlich danken.

Herrn Professor Dr. H.-B. Wuermeling, Vorstand des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg, danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Korreferates und den Arbeitsplatz.

Herrn Opitz bin ich für die große Hilfe bei der Anfertigung der graphischen Darstellungen zu tiefem Dank verbunden.

Lebenslauf

Personalien: Lie, Mei Lan
geb. 12. Juni 1947
in Banjarmasin, Süd-Borneo/Indonesien

Eltern: Lie, Thay Tjhiang, Kaufmann
Thio, Lian Hiang

Ausbildung: 1952 - 1958 Volksschule
in Banjarmasin
1958 - 1961 Mittelschule St. Maria
in Banjarmasin
1961 - 1964 Oberschule St. Ursula
in Jakarta
1964 Reifeprüfung
1965 - 1970 Medizinstudium an der
Universität Tarumanagara
in Jakarta
1973 Umzug nach Deutschland
1974 - 1978 Medizinstudium an der
Friedrich-Alexander
Universität Erlangen-
Nürnberg
1978 Ärztliche Prüfung

COPY-PRINT R. LEHMPFUHL
Marquardsenstr. 21 8520 Erlangen